

Reference 3

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 10337180 A

(43) Date of publication of application: 22.12.1998

(51) Int. Cl. C12N 5/06
C12N 1/38

(21) Application number: 09149708
(22) Date of filing: 08.06.1997

(71) Applicant: RES DEV CORP OF JAPAN
(72) Inventor: SATO GEN
YOSHIZATO KATSUTOBHI

(54) CULTIVATION OF LIVER CELL

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for efficient cultivation of liver cells, in which liver cells collected from a matured mammal are cultured in a medium containing pleiotrophin, fetal bovine serum, an ascorbic acid and nicotinamide, to form the colony.

SOLUTION: This method for efficient successive cultivation of liver cells comprises (A) primary cultivation to form the colony, in which liver cells collected from a matured mammal are cultured in a DMEM medium

or the like containing pleiotrophin, fetal bovine serum, an ascorbic acid, nicotinamide, DMSO and epidermal growth factor, (B) separation of the colony cells from the medium by the aid of an EDTA/trypsin solution, (C) dispersion of the separated liver cells individually, and (D) cultivation of these individually dispersed liver cells in a medium containing pleiotrophin, fetal bovine serum, an ascorbic acid, nicotinamide, DMSO and epidermal growth factor, to form the colony. The liver cell is useful as a research material for studying, e.g. its evolution, differentiation, division, canceration mechanisms involved or the like, or as a medical material, e.g. for treatment of liver diseases.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-337180

(43) 公開日 平成10年(1998)12月22日

(51) Int.Cl.⁵

C12N 5/08
1/38

識別記号

P I

C12N 5/00
1/38

E

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平9-149708

(22) 出願日

平成9年(1997)6月6日

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 佐藤 玄

広島県東広島市西条大坪町3-19-5 リ

バーサイド2-201

(72) 発明者 吉里 勝和

広島県東広島市八本松南7-22-13

(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

(54) 【発明の名称】 肝細胞の培養方法

(57) 【要約】

【課題】 3 T 3 細胞由来の肝細胞増殖因子を用いて、成熟哺乳動物の肝細胞を効率よく培養するための方法を提供する。

【解決手段】 成熟哺乳動物の肝臓から分取した肝細胞を、プレイオトロフィン、牛胎児血清、アスコルビン酸類およびニコチンアミド類を添加した培地で培養してコロニーを形成させることを特徴とする肝細胞の培養方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 成熟哺乳動物の肝臓から分取した肝細胞を、プレイオトロフィン、牛胎児血清、アスコルビン酸類およびニコチンアミド類を添加した培地で培養してコロニーを形成させることを特徴とする肝細胞の培養方法。

【請求項2】 培地が、上皮細胞成長因子およびDMSOを含有するDMEM培地である請求項1の肝細胞の培養方法。

【請求項3】 成熟哺乳動物の肝臓から分取した肝細胞を、牛胎児血清、アスコルビン酸類およびニコチンアミド類を添加した培地で初代培養してコロニーを形成させたのち、EDTA/トリプシン溶液によってコロニーの細胞を培地から剥がして肝細胞を個々に分散させ、これらの分散させた肝細胞を、プレイオトロフィン、牛胎児血清、アスコルビン酸類およびニコチンアミド類を添加した培地で培養することによってコロニーを形成させることを特徴とする肝細胞の継代培養方法。

【請求項4】 培地が、上皮細胞成長因子およびDMSOを含有するDMEM培地である請求項3の肝細胞の継代培養方法。

【請求項5】 成熟哺乳動物の肝臓から分取した肝細胞を、プレイオトロフィン、牛胎児血清、アスコルビン酸類およびニコチンアミド類を添加した培地で培養してコロニーを形成させたのち、EDTA/トリプシン溶液によってコロニーの細胞を培地から剥がして肝細胞を個々に分散させ、これらの分散させた肝細胞を上記培地で培養することによってコロニーを形成させることを特徴とする肝細胞の継代培養方法。

【請求項6】 培地が、上皮細胞成長因子およびDMSOを含有するDMEM培地である請求項5の肝細胞の継代培養方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、肝細胞の培養方法に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、肝細胞の発生・分化や分裂増殖過程、あるいはその癌化メカニズム等に関する細胞生物学的、分子生物学的研究の材料として、あるいは様々な肝疾患の治療技術開発のための医療材料として有用な肝細胞を効率よく初代培養および継代培養するための方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】動物個体は、一つの受精卵が分裂を繰り返して、異なる機能を分担する各種の組織（細胞集合体）へと分化した多細胞生物である。そして、身体を構成する各組織の場合には、それぞれの細胞が常に分裂増殖し、活発に分化機能発現能を有する細胞を次々と産生することによって個体が維持されている。従って、ヒトをはじめとする動物個体の生物学的実体を理解し、あるいは発癌のメカニズム等を解明してその治療法

を開発するためには、各組織を構成する細胞を細胞生物学的、分子生物学的に詳細に分析し、その発生・分化過程や分裂増殖の機構を明らかにすることが重要であると考えられる。

【0003】従来より、生体組織の細胞を詳細に分析するための手段として、生体外へ取り出した細胞を培養し、さらには培養細胞を分裂増殖させて継代的に生存させる方法が確立している。ところが、ラットやヒトの肝細胞については、これまで成熟個体から単離した初代細胞を継代的に培養することは不可能であるとされてきた。すなわち、接着依存性の成熟肝細胞は、その継代操作のために培養基質から剥離する際に大きく損傷し、また培養基質に再接着させることも困難であるなどの理由から、継代培養系において肝細胞の発生過程や分裂増殖状態を研究することは不可能であった。

【0004】この発明の発明者等は、培養培地の成分等を工夫することによって上記の困難性を克服し、成熟ラットの肝臓から採取した初代細胞を継代培養することに成功し、その培養方法を既に特許出願している（特願平6-89056号）。またこの発明の発明者等は、従来その存在が確認されていなかった肝前駆細胞（progenitor cells）を含むと考えられるクローン性増殖能を有する肝実質細胞とその取得方法、並びにそれらの細胞を継代的に培養するための方法を発明し、既に特許出願している（特願平7-213686号）。

【0005】そしてさらにこの発明の発明者らは、肝細胞の培養培地中に3T3細胞の培養上清（コンディショニングメディウム：CM）を添加するか、あるいは肝細胞と3T3細胞とを共培養することによって、少数の肝細胞を効率よく増殖させることが可能であることを見出し、これらの培養方法を特許出願している（特願平8-133985号）。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】上記特願平8-133985号の方法において、3T3細胞のCMまたは3T3細胞との共培養が肝細胞の増殖を促進することから、3T3細胞が何らかの肝細胞増殖因子を産生していることが想定される。そこでこの発明は、3T3細胞が産生する肝細胞増殖因子を特定し、この増殖因子を用いることによって肝細胞をさらに効率よく培養することのできる改良された培養方法を提供することを目的としている。

【0007】

【課題を解決するための手段】この発明の発明者等は、3T3細胞が産生する肝細胞増殖因子を特定することを目的として鋭意研究した結果、この因子がプレイオトロフィンであることを見出し、この発明を完成させた。すなわち、この発明は上記の課題を解決するための第1の発明として、成熟哺乳動物の肝臓から分取した肝細胞を、プレイオトロフィン、牛胎児血清、アスコルビン酸

類およびニコチンアミド類を添加した培地で培養してコロニーを形成させることを特徴とする肝細胞の培養方法を提供する。

【0008】また、第2の発明として、成熟哺乳動物の肝臓から分取した肝細胞を、牛胎児血清、アスコルビン酸類およびニコチンアミド類を添加した培地で初代培養してコロニーを形成させたのち、EDTA/トリプシン溶液によってコロニーの細胞を培地から剥がして肝細胞を個々に分散させ、これらの分散させた肝細胞を、プレ

イオトロフィン、牛胎児血清、アスコルビン酸類およびニコチンアミド類を添加した培地で培養することによってコロニーを形成させることを特徴とする肝細胞の継代培養方法を提供する。

【0009】さらに、第3の発明として、成熟哺乳動物の肝臓から分取した肝細胞を、プレイオトロフィン、牛胎児血清、アスコルビン酸類およびニコチンアミド類を添加した培地で培養してコロニーを形成させたのち、EDTA/トリプシン溶液によってコロニーの細胞を培地から剥がして肝細胞を個々に分散させ、これらの分散

させた肝細胞を上記培地で培養することによってコロニーを形成させることを特徴とする肝細胞の継代培養方法を提供する。

【0010】なお、これらの方法においては、培地が、上皮細胞成長因子およびDMSOを含有するDMEM培地であることを好ましい態様としている。

【0011】
【発明の実施の形態】上記第1の発明における初代培養の対象となる肝細胞は、成熟哺乳動物の肝臓を構成する全ての種類の細胞であって、公知の方法によって動物の肝臓から単離し、低速遠心法(50G)による沈殿画分に含まれる細胞を培養する。この時、第1の発明では、培養培地として、プレイオトロフィン(pleiotrophin: PTN)、牛胎児血清(FBS)、アスコルビン酸類(例えばL-アスコルビン酸リン酸塩)およびニコチンアミド類を添加した培地を用いる。

【0012】すなわち、上記先願発明(特願平8-133985号)における培養方法では、肝細胞のコロニー形成成分としてFBSおよびアスコルビン酸類を含む培地と、肝細胞の増殖促進成分である3T3細胞CMとの混合培地で肝細胞を培養することを1つの態様としているが、この発明の方法では、この培地に添加する3T3細胞のCMの代わりに、PTNを添加することを特徴としている。

【0013】このPTNはヘパリン結合タンパク質の1種であり、神経細胞に対する成長因子、栄養因子としての作用が知られている。また、体細胞については、線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞等に対する分裂促進作用が一部で報告されているが、他方ではこのような作用を否定する結果も報告されており、PTNの体細胞に対する効果は確立していない(The Journal of Biological Ch

emistry, Vol.267 No.36, pp25889-25897, 1992)。特に、肝細胞に対する生理活性は従来全く知られていなかった。

【0014】このPTNは、組換えヒトPTNとして市販されており(R&D Systems Inc.社製)、この発明の方法にもこの市販品を用いることができる。また、例えば先願発明(特願平8-133985号)と同様にして調製した3T3細胞のCMあるいはその他の動物細胞の培養上清等から、後述する分離、精製方法によって得ることができる。あるいは、既存のcDNAライブラリーを用い、PTNの既知のミノ酸配列の一部をプローブとしてこのライブラリーからPTNのコード配列を単離し、このコード配列を適当な宿主ベクター系で発現させることによって3T3細胞由来のPTNを取得することができる。

【0015】また、上記必須成分であるPTN、FBS、アスコルビン酸類およびニコチンアミド類を添加する培地としては、具体的には、上皮細胞成長因子およびDMSOを含有するDMEM培地を用いることができる。これらの上皮細胞成長因子(EGF)およびDMSOはコロニーの形成に必須ではないが、コロニーの形成促進作用を有するため、培養培地に添加する成分として好ましい。さらに、低速遠心による画分には、肝細胞以外にも、内皮細胞、クッパー細胞、星細胞、胆管上皮細胞等が含まれ、肝細胞に特殊な環境を提供していると考えられるが、上記のニコチンアミド類、アスコルビン酸類およびDMSOはそれらの非実質細胞の増殖を抑制し、肝実質細胞を選択的に培養増殖させることを可能にする。これらの成分の培地中への添加量は、例えば、PTNは0.1ng/ml~10μg/ml、FBSは5~30%、アスコルビン酸類は0.1~1.0mM、EGFは1~100ng/ml、ニコチンアミド類は1~20mM、そしてDMSOは0.1~2%程度とすることが出来る。培養は、5%CO₂条件下で、37℃前後の温度で行う。

【0016】以上の通りの培養によって、初代培養による肝細胞コロニーが得られる。さらに、これらのコロニーを形成する細胞に対しては、先願発明(特願平8-133985号)の方法によってスクリーニングすることによって、肝実質細胞と非実質細胞を同定することができる。次に、この発明の肝細胞の継代培養方法(第2および第3の発明)について説明する。

【0017】すなわち、この方法は、初代培養によって得た肝細胞のコロニー(初代培養細胞)をシャーレから剥がし、別のシャーレにおいて再培養し、増殖させる方法である。初代培養方法は、上記先願発明(特願平7-213686号)と同様の方法でもよく(第2発明)、あるいは、上記第1発明による初代培養方法でもよい(第3発明)。いずれの方法で得た初代培養細胞の場合も、コロニーを剥がす際には、シャーレから培地を取り除いた後、コロニーにEDTA(0.002~0.2%)

およびトリブシン (0.005~0.5%) の溶液を添加して約10分間処理することによって、コロニーを肝細胞と非実質細胞とに分離することができる。そしてこれらの細胞分離液をフィルター (孔径約20 μ m) で濾過し、小さなアグリゲーションを除くことによって、細胞を個々に分散することができる。

【0018】そして、この発明の継代培養方法では、このようにして分散させた細胞を、PTN、FBSおよびアスコルビン酸類を添加した培地で再培養する。これによって、少ない細胞播種密度 (例えば、1 \times 10⁴ cell s/35mm dish) 程度の細胞数であっても良好にコロニーを形成させることができる。培地の具体的成分等は、上記第1の発明のものと同様とすることができる。

【0019】以上の通りのこの発明の方法は、ヒトをはじめとする全ての哺乳動物の肝細胞に適用することができる。様々な動物種から得たクローン性増殖能を有する肝細胞 (肝実質細胞) にコロニーを形成させて初代培養し、さらにこの初代培養細胞を継代的に培養することができる。そして、例えばヒトの肝臓から採取したクローン増殖能を有する肝実質細胞の継代培養細胞は、ハイブリッド肝臓等の作成に利用することができ、肝疾患の治療技術の開発にも新たな展開をもたらすものと期待される。

【0020】以下、実施例を示して、この発明の継代培養方法をさらに詳細かつ具体的に説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではない。

【0021】

【実施例】

実施例1: PTNの調製

シャーレ中に播種した3T3細胞 (5 \times 10⁵ cells/10cm dish) を10% FBS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含むDMEM培地中でコンフルエントまで培養し、PBSで2回洗浄した後、さらにFBSを含まないDMEM培地に換え、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下で48時間培養した。この培地 (3T3CM) を0.45 μ m 孔径のフィルターで濾過し、さらに限外濾過膜で50倍に濃縮した。

【0022】次いで、この濃縮した3T3CMをヘパリンカラムで分画した。ヘパリンカラムは予めPBSバッファーで平衡化しておき、カラムに吸着したタンパク質を同バッファーに溶解したNaClの濃度勾配 (0.15M~1.5M) で溶出した。得られた画分を0.22 μ m 孔径のフィルターで濾過して滅菌した後、DMEM培地 (10% FBS, 44mM NaHCO₃, 20mM HEPES, 0.5mg/l インシュリン, 10⁻⁷M デキサメタゾン, 30mg/l レuprolin, ペニシリン, ストレプトマイシン, 10mMニコチンアミド, 10ng/ml EGFおよび0.2mM L-アスコルビン酸リン酸塩含有) に添加し、肝細胞を培養した。培養4日目

合成を測定した。その結果、NaClが0.8M以上の濃度の画分を培地に添加した場合に、肝細胞へのBr d U 取り込み量が増加し、DNA合成の促進が確認されたことから、この分画に肝細胞増殖因子が存在することが判明した。

【0023】そこで、ヘパリンカラムから得られた画分のうち、NaClが0.8M以上、1.5M以下の画分を集め、さらにゲル濾過カラムによって分画した。カラムは予めPBSバッファーで平衡化しておき、タンパク質を同バッファーで溶出した。得られた複数のタンパク質の肝細胞増殖活性を、上記と同様のBr d U 取り込み量によって測定したところ、分子量1万以上、2万以下のタンパク質画分が肝細胞増殖活性を持つことが確認された。この画分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べたところ、分子量1万~2万Daの間には1本のバンドが観察されたのみであり、このバンドから1種類のタンパク質が精製された。

【0024】このタンパク質のアミノ酸配列を決定した結果、このタンパク質のアミノ酸配列中の15連続アミノ酸が公知のマウスPTNのアミノ酸配列 (Biochemical and Biophysical Communications, vol.173, No.1, p246-251, 1990) と100%一致したことから、このタンパク質が3T3細胞由来のPTNであることが確認された。

実施例2: 肝細胞の取得と初代培養

10週令のフィシャーラットからコラゲナーゼ灌流法により肝臓の細胞を採取し、低速遠心 (50g, 1分 \times 3回) して得た沈殿として実質細胞画分を得た。この細胞を、3.5cm径の培養皿に4 \times 10⁴ 個ずつ播き、DMEM培地 (10% FBS, 44mM NaHCO₃, 20mM HEPES, 0.5mg/l インシュリン, 10⁻⁷M デキサメタゾン, 30mg/l レuprolin, ペニシリンおよびストレプトマイシン含有) 中で、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下で2~3時間培養した。次いで、培養培地を、上記培地に実施例1のPTN (10ng/ml)、10mMニコチンアミド、10ng/ml EGFおよび0.2mM L-アスコルビン酸リン酸塩を加えたDMEM培地に交換し、さらに4日目からは1%DMSOを培地に加え、培養を続けた。また、3T3細胞由来のPTNの代わりに市販の組換えヒトPTN (R&D Systems Inc.社製) を加えた場合、およびPTNを加えない場合 (コントロール) についても培養を行い、肝細胞の増殖の程度をBr d Uの取り込みを指標として測定した。

【0025】その結果、PTN (3T3細胞由来および市販品) は肝細胞の増殖を促進させることが確認された。

実施例3: 小型肝細胞の継代培養

実施例2の初代培養において肝細胞コロニーが形成されたシャーレから培地を取り除き、コロニーを0.02% EDTAおよび0.05% トリブシンで処理し、コロニーの肝細胞を溶液中に分散させた。この細胞分散液をビベッティン

グし、肝細胞の各々の分散液を得た。次いで、これらの分散液を、孔径 $20\mu\text{m}$ のフィルターで濾過し、小さな細胞のアグリゲーションを除去し、個々の細胞をほぼ分散させた。この分散細胞をシャーレにうすく蒔き、実施例1で調製したPTNを添加したDMAEM培地(10% PBS, 44mM NaHCO_3 , 20mM HEPES, 0.5mg/l インシュリン, 10^{-7}M デキサメタゾン, 30mg/l レuprolin, ペニシリンおよびストレプトマイシン含有)で再培養してコロニーの形成およびコロニー当たりの細胞数を計測した。またコントロールとして、PTNを含まない新鮮なDME

10

【0026】その結果、コントロールと比較して、PTNを添加した培地で培養した肝細胞は良好にコロニーを形成し、しかもコロニー当たりの細胞数もコントロールより有意に多かった。

【0027】

【発明の効果】以上詳しく説明した通り、この発明によって、成熟哺乳動物の肝細胞を、より効率良くクローン形成させて、しかも継代的に培養することが可能となる。これにより、肝細胞の発生・分化過程や、その増殖および機能発現機構を詳細に研究することが可能となり、また肝癌をはじめとする様々なヒト肝疾患のメカニズム解明と、その治療法の開発に新たな途が拓ける。

POLYNUCLEOTIDE AMPLIFICATION ANALYSIS USING A MICROFABRICATED DEVICE

Publication number: JP7506257 (T)

Publication date: 1995-07-13

Inventor(s):

Applicant(s): UNIV PENNSYLVANIA [US]

Classification:

- International: A01K67/02; B01D61/18; B01D67/00; B01D71/02; B01J19/00; B01L3/00; B01L7/00; C12M1/00; C12M1/26; C12M1/34; C12M3/00; C12M3/08; C12N15/09; C12Q1/68; G01N11/04; G01N27/07; G01N33/483; G01N33/50; G01N33/543; G01N37/00; A61B17/04; B01F5/06; B01L9/00; C40B40/06; A01K67/00; B01D61/18; B01D67/00; B01D71/00; B01J19/00; B01L3/00; B01L7/00; C12M1/00; C12M1/26; C12M1/34; C12M3/00; C12M3/08; C12N15/09; C12Q1/68; G01N11/00; G01N27/06; G01N33/483; G01N33/50; G01N33/543; G01N37/00; A61B17/04; B01F5/06; B01L9/00; C40B40/04; (IPC1-7): C12M3/08; C12M1/34; G01N33/50

- European: B01D61/18; B01D67/00H10D; B01D71/02; B01J19/00C; B01J19/00R; B01L3/00C6M; B01L7/00D; B01L7/00D2; C12M1/26; C12M1/34; C12M3/00; C12M3/08; C12Q1/68D4

Application number: JP19930519504T 19930429

Priority number(s): WO1993US04018 19930429; US19920877536 19920501; US19920877661 19920501; US19920877662 19920501; US19920877701 19920501; US19920877702 19920501

Also published as:

JP3207424 (B2)

WO9322058 (A1)

WO9322055 (A2)

WO9322055 (A3)

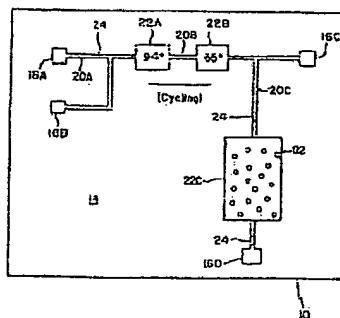
WO9322421 (A1)

more >>

Abstract not available for JP 7506257 (T)

Abstract of corresponding document: WO 9322058 (A1)

Disclosed are devices for amplifying a preselected polynucleotide in a sample by conducting a polynucleotide polymerization reaction. The devices comprise a substrate microfabricated to define a sample inlet port (16A) and a mesoscale flow system (20), which extends from the inlet port (16A). The mesoscale flow system (20) includes a polynucleotide polymerization reaction chamber (22) in fluid communication with the inlet port which is provided with reagents required for polymerization and amplification of a preselected polynucleotide. In one embodiment the devices may be utilized to implement a polymerase chain reaction (PCR) in the reaction chamber (PCR chamber).; The PCR chamber (22) is provided with the sample polynucleotide, polymerase, nucleoside triphosphates, primers and other reagents required for the polymerase chain reaction, and the device is provided with means for thermally controlling the temperature of the contents of the reaction chamber at a temperature controlled to dehybridize double stranded polynucleotide, to anneal the primers, and to polymerize and amplify the polynucleotide.



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide